

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ IN VITRO МАРИТ MICROPHALLUS PYGMAEUS (TREMATODA: MICROPHALLIDAE)

Н. А. Михайлова, О. И. Подгорная

На трех близких по составу искусственных средах (Игла, ЕМЕМ, ДМЕ) из метацеркарий *M. pygmaeus* выращены половозрелые мариты. Проведено морфологическое описание гермафродитных особей на разных стадиях маритогонии и полового размножения червей. Максимальное время содержания *M. pygmaeus* в условиях *in vitro* составило 9 сут.

Выращивание трематод на искусственных питательных средах — весьма перспективный методический прием для решения паразитологических задач. Он открывает широкие возможности как для постановки жизненных циклов сосальщиков в лабораторных условиях, так и для проведения самых разнообразных экспериментальных исследований, особенно в тех случаях, когда получение природного материала затруднительно. На червях, выращенных *in vitro*, удобно изучать морфологические, физиологические, биохимические и другие особенности в процессе роста и развития.

Для отработки методики культивирования трематод нами был избран *Microphallus pygmaeus* (сем. Microphallidae), принадлежащий к группе морфологически и экологически близких видов группы «*pygmaeus*» (Галактионов, 1983, 1984). Промежуточным хозяином этих сосальщиков служат литоральные моллюски рода *Littorina*, дефинитивным — морские птицы, обычно гага (*Somateria mollissima*) или чайки (виды рода *Larus*). Как и все микрофаллиды этой группы, *Microphallus pygmaeus* характеризуется аберрантным жизненным циклом, с выпадением фазы свободноживущей церкарии. Развитие личинок гермафродитного поколения в промежуточном хозяине — моллюске заканчивается формированием инвазионных метацеркарий, имеющих вполне развитые пищеварительную, выделительную, половую и другие системы органов (Галактионов, Добровольский, 1987). В связи с этим в организме окончательного хозяина процессы маритогонии и полового размножения протекают быстро.

Предлагаемая статья посвящена обсуждению методов культивирования и морфологическому описанию выращенных марит *M. pygmaeus* на разных стадиях развития.

Материал и методы. Материал был собран в ноябре 1986, январе 1987 и 1988 гг. в губе Ярнышной Баренцева моря. Спороцисты с инвазионными метацеркариями *M. pygmaeus* извлекали из печени и гонад зараженных моллюсков *Littorina saxatilis* под бинокуляром и помещали в растворы Хэнкса или Рингера для холоднокровных животных с добавлением антибиотиков: тетрациклина (100 ед./мл), пенициллина (200 ед./мл) и стрептомицина (100 мг/мл). При перенесении спороцист из зараженного моллюска в питательную среду стенки тела партенит остаются интактными и самостоятельного выхода личинок наружу не происходит. Ферментативная обработка спороцист трипсином (концентрация 0,02 мг/мл) также не дала положительных результатов. Поэтому для извлечения зрелых метацеркарий стенки тела спороцист разрывали препаровальными иглами.

В качестве субстратов для выращивания марит *Microphallus pygmaeus* использовали три типа стерильных сред: Игла (Eagle's Medium), ЕМЕМ (Modified Eagle's Medium) и ДМЕ (Dulbecco's Modified Medium) (Gibco, Product Catalogue). Две последние представляют собой модификации среды Игла, отличаясь от нее лишь более богатым содержанием некоторых аминокислот (глютамин, изолейцин, лизин и др.), витаминов и неорганических солей. Во всех трех случаях к средам добавляли 10 % коровьей сыворотки (КС), гентамицина 300 мг/мл) и глютамин. Готовые среды (рН 7,2—7,4) в стерильных условиях разливали по 2—3 мл в чашки Петри, диаметром 4 см, в которые высаживали метацеркарий *M. pygmaeus*. Чашки со средой помещали во влажный CO₂-инкубатор, при 37°, под газовой фазой из 5 %-го CO₂ в воздухе. Замену сред в чашках Петри в процессе культивирования не производили. Максимальное время содержания марит *M. pygmaeus* *in vitro* составило 9 сут.

Наблюдение за ростом и развитием марит проводили под инвертированным микроскопом. Препараты живых половозрелых червей просматривали под микроскопами JENAVAL и МБИ-15,

с использованием фазово-контрастного устройства, при увеличениях $\times 120$, $\times 220$, $\times 350$, на кафедре зоологии беспозвоночных Ленинградского университета. Работа по культивированию марит проведена на базе лаборатории стабильности хромосом и клеточной инженерии Института цитологии АН СССР.¹

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе работы по выращиванию трематод установлено, что во всех трех средах темпы роста и дифференцировки марит *M. rugtaeus* одинаковы. В связи с этим мы приводим обобщенные данные наблюдений.

Развитие особей гермафродитного поколения в окончательном хозяине включает в себя два этапа. Во время первого из них — маритогонии — идет созревание червей, которые, достигая половой зрелости, начинают продуцировать яйца. Этот процесс у *M. rugtaeus* непродолжителен. *In vitro* он заканчивается через 1,5—2 сут после начала культивирования, что объясняется прогенетическим развитием личиночных стадий микрофаллид еще в промежуточном хозяине.

После помещения инвазионных метацеркарий в среду личинки сразу начинают активно двигаться и питаться. Хорошо заметно, как поглощаемая среда продвигается по пищеводу и, поступая в ветви кишечника, накапливается в них (см. рисунок, а; см. вкл.). По всей видимости, окончательная дифференцировка кишечного эпителия у марит проходит за очень короткий промежуток времени. Через 2—3 ч заметно расширяются каналы выделительной системы, начинает сокращаться мочевой пузырек, выбрасывая наружу продукты метаболизма (см. рисунок, б). К концу 1-х суток нахождения личинок в среде увеличиваются в размерах циртоциты.

Мужская половая система начинает функционировать раньше, чем женская. Уже через 2—3 ч в семенниках появляется зрелая сперма, а яйцеклетки начинают выходить в просвет яйцевода только по истечении 1-х суток. Через 48—50 ч в петлях матки появляются первые, еще abortивные яйца, покрытые тонкими скорлуповыми оболочками (см. рисунок, в). Червям на этой стадии не свойственна интенсивная работа желточников: в просветах желточных протоков появляются лишь отдельные клетки или их небольшие группы (см. рисунок, г). В этот период количество производящихся яиц еще невелико (по 1—3 яйца у каждой особи). Описанное состояние половой системы характерно для начальных этапов ее функционирования. Появление abortивных яиц может объясняться недостаточной работой желточников, скорлуповых желез или же отсутствием процесса оплодотворения.²

Второй этап жизни в окончательном хозяине — период полового размножения (по сравнению с маритогонией) более растянут во времени. Вплоть до последних 9-х суток опыта гибель марит не наблюдалась, хотя заметно снизилась скорость поглощения ими питательной среды и двигательная активность.

На 4-е сутки инкубации интенсифицируется работа желточников. Теперь их протоки сплошь забиты желточными клетками, продвигающимися к оотипу (см. рисунок, г, д). Расширяются петли матки, среди abortивных появляются и зрелые яйца с вполне сформированными зародышами и скорлуповыми оболочками. Среднее число яиц у особей в этот период достигает двух десятков. Первые яйца (в небольшом количестве) выметывают 6-дневные особи, а на 7-е сутки этот процесс достигает максимума (50 шт. на 1 особь) (см. рисунок, е). Среди огромного числа выброшенных яиц присутствует значительное количество abortивных (см. рисунок, з). К 9-дневному сроку петли матки, занимающие почти весь задний отдел тела, остаются практически пустыми (чаще 5—7 яиц, реже 10—20) (см. рисунок, ж).

¹ За предоставленную возможность и помощь в проведении исследования авторы выражают глубокую признательность заведующему лабораторией Н. В. Томилину и н. с. Ф. Л. Виханская.

² Вопрос о характере оплодотворения у микрофаллид группы «rugtaeus» остается пока невыясненным. Авторам не известны литературные источники, описывающие процесс копуляции этих трематод в природных условиях. *In vitro* нами также не зарегистрировано случаев перекрестного оплодотворения. По крайней мере в экспериментальных условиях имеет место лишь самооплодотворение. Однако в чашках с 5-дневными маритами обнаружены особи, сложенные попарно на манер букв известной монограммы «Советской Энциклопедии». Вопрос о том, имеет ли это отношение к спариванию, требует дальнейших исследований.

Обсуждение. Сведения об экспериментальном выращивании трематод сем. *Microphallidae* крайне ограничены. В работе Джеймса (James, 1971) приведены результаты культивирования марит *M. pygmaeus* на среде 199+10 % КС (Medium 199). Получены весьма низкие показатели плодовитости: первые яйца у половозрелых червей появляются на 5-е сутки, а их наибольшая численность (20 шт.) зарегистрирована на 8-е сутки инкубации в среде. Аналогичные данные, полученные при экспериментальном заражении птенцов чаек, утят и мышей, несколько выше: максимальное число яиц (70 шт.) созревает в маритах *M. pygmaeus*, выращенных в мышах на 9-е сутки. Однако автор отмечает, что успешнее всего развитие паразитов протекает в птенцах чаек — каждая 40-я метацеркария достигает половой зрелости (для утят и мышей этот показатель значительно ниже). При экспериментальном заражении белых мышей метацеркариями *M. pygmaeus* (Галактионов, 1980) число яиц у половозрелых сосальщиков составило 1—10 и 50—70 шт. на 4-е и 7-е сутки соответственно. Эти цифры близки к таковым при культивировании червей *in vitro*, однако она в 3 раза ниже величин, характеризующих плодовитость паразитов в специфичном дефинитивном хозяине — птенцах чайки (Галактионов, 1980). Сравнивая данные Джеймса, Галактионова и наши, можно сказать, что в целом сроки созревания и плодовитость червей *M. pygmaeus* *in vitro* и в мышах оказались близкими. По всей видимости, искусственные питательные среды, используемые для культивирования клеток млекопитающих при температуре 37°, хорошо имитируют условия жизни червей в мышах. Низкие показатели плодовитости *M. pygmaeus* из мышей могут объясняться неспецифичностью последних как окончательных хозяев и пониженной температурой по сравнению с температурой тела птиц (42°).

Фуджино с соавторами (Fujino e. a., 1977) для культивирования *Microphalloides japonicus* использовали среды ЕМЕМ и NCTC — 109 (обе с добавлением 20 %-го КС), а также растворы Кребс-Рингер, Хэнкс и 0.85 %-го NaCl. Данные приведены для марит, содержащихся в средах в течение 5 дней. В опытах этих исследователей максимальное количество яиц (239) зарегистрировано у марит, инкубированных в среде NCTC, — 109+20 % КС, при среднем — 45.2 шт./экз. Однако среднее количество яиц выше у червей, культивируемых в среде ЕМЕМ+20 % КС, — 94.4 шт./экз., при максимуме — 192. Плодовитость половозрелых червей *M. japonicus*, полученных *in vitro*, в 4 раза меньше, чем в природе. Описание морфогенеза марит авторы не приводят.

По данным Дэвиса и Смита (Davies, Smyth, 1979), лучшие результаты по выращиванию *Microphallus similis* в искусственных условиях получены для среды NCTC+20 % КС. Развитие марит прослежено в течение 5 дней. В 100 % случаев у культивируемых червей созревали яйца. Однако авторы отмечают, что доля abortивных яиц больше доли нормально развитых. Так, у 4-дневных червей максимальное число полноценных яиц — 44, а abortивных — 59.

Полученные нами данные в целом согласуются с литературными. Однако различные условия существования в тех или иных хозяевах, естественно, не позволяют использовать какую-либо универсальную среду для выращивания микрофаллид. В каждом конкретном случае ее необходимо подбирать эмпирически. Описанные в литературе низкие показатели плодовитости гермафродитных особей *in vitro* свидетельствуют о необходимости продолжить поиск оптимальных сред для культивирования.

Л и т е р а т у р а

- Галактионов К. В. Партеногенетические поколения трематод семейства *Microphallidae* Travassos, 1920 (развитие, размножение, экология): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 1980. 144 с.
- Галактионов К. В. Микрофаллиды группы «*pygmaeus*». I. Описание видов *Microphallus pygmaeus* (Levinsen, 1881) Nec Odhner, 1905 и *M. piriformes* (Odhner, 1905) Nom Nov (Trematoda: *Microphallidae*) // Вест. ЛГУ. 1983, № 15. С. 20—30.
- Галактионов К. В. Микрофаллиды группы «*pygmaeus*». II. Описание вида *Microphallus triangulatus* sp. nov. (Trematoda: *Microphallidae*) // Вест. ЛГУ. 1984, № 3. С. 5—11.
- Галактионов К. В., Доброловский А. А. Гермафродитное поколение трематод. Л.: Наука, 1987. 193 с.
- Davies C., Smyth J. D. The development of the metacercariae of *Microphallus similis* *in vitro* and in the mouse // Int. J. Parasitol. 1979. Vol. 9. P. 261—267.
- Fujino T., Hamajima F., Ishii Y., Mori R. Development of *Microphalloides japonicus* (Osborn, 1919) metacercariae *in vitro* (Trematoda: *Microphallidae*) // J. of Helminthol. 1977. Vol. 52, N 2. P. 125—129.
- Gibco. Product Catalogue. Life Technologies Inc., s. a. P. 116—117.

James B. L. Host selection and ecology of marine digenetic larvae // Marine larvae (Edited by Crisp D. J.). Report on the 4th European Marine Biological Symposium. Cambridge University Press, 1971. P. 179—196.

Мурманский морской биологический
институт КНЦ АН СССР,
Дальние Зеленцы;
Институт цитологии АН СССР,
Ленинград

Поступила 25.07.1988

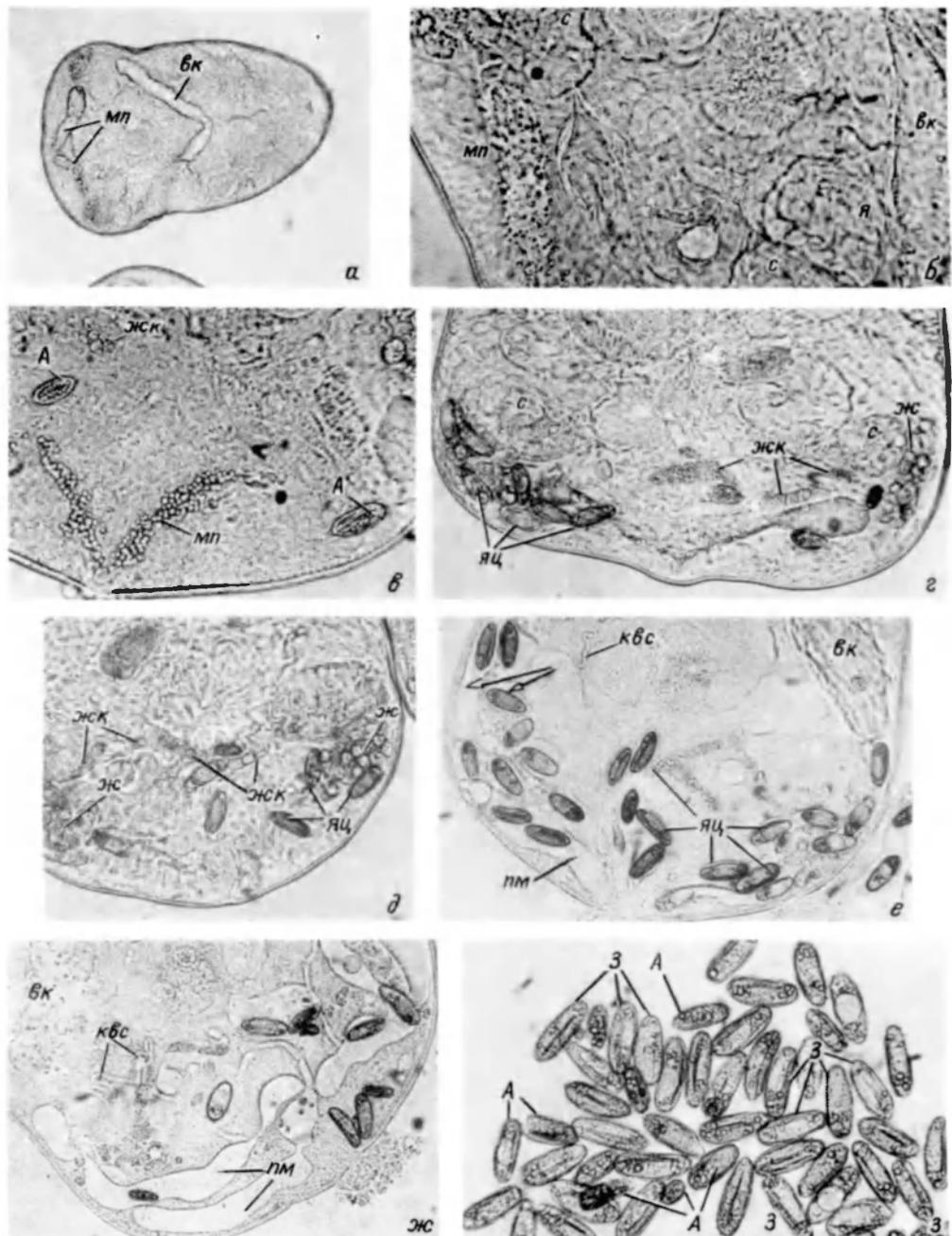
CULTIVATION OF ADULTS OF MICROPHALLUS PYGMAEUS
(TREMATODA, MICROPHALLIDAE) IN VITRO

N. A. Mikhailova, O. I. Podgornaya

S U M M A R Y

Adult forms of *Microphallus pygmaeus* were reared from metacercariae on three similar artificial media. Morphological description of hermaphrodite specimens at different stages of matogony and sexual breeding was given. Maximum period of maintenance in vitro for *M. pygmaeus* was 9 days.

Вклейка к ст. Н. А. Михайловой и др.



Мариты *M. rugitaeus* на разных стадиях созревания *in vitro*.

a — 1-е сутки, ув. 120; *b* — 1-е сутки, ув. 350; *c* — 2.5 сут, ув. 350; *d* — 3.5 сут, ув. 220; *e* — 4 сут, ув. 220; *f* — 7 сут, ув. 220; *ж* — 9 сут, ув. 220; *з* — яйца, выметанные во внешнюю среду, ув. 450. *вк* — ветви кишечника; *мп* — мочевой пузырек; *кbs* — каналы выделительной системы; *с* — семенник; *я* — яичник; *жк* — желточные клетки; *пм* — петли матки; *яц* — яйцо; *A* — абортивное яйцо; *З* — зрелое яйцо.